



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENTAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 196 42 777 A 1**

⑤ Int. Cl.⁶:
B 01 J 19/00
C 12 M 1/00
C 12 M 1/12
B 01 L 3/00

⑲ Aktenzeichen: 196 42 777.0
⑳ Anmeldetag: 16. 10. 96
㉑ Offenlegungstag: 28. 5. 98

DE 196 42 777 A 1

⑦ Anmelder:
Vetter, Dirk, Dr., 07743 Jena, DE

⑧ Vertreter:
R.-G. Pfeiffer und Kollegen, 07743 Jena

⑬ Erfinder:
Erfinder wird später genannt werden

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

Der Inhalt dieser Schrift weicht von dem am Anmeldetag eingereichten Unterlagen ab

⑭ Reaktor für mikrochemische bzw. mikrobiologische Synthesen

⑮ Die Erfindung betrifft einen einfach aufgebauten Reaktor für die mikrochemische bzw. mikrobiologische Synthese, der im Laborbetrieb eine erhebliche Vereinfachung und Beschleunigung der Syntheseschritte sowie eine Verringerung des instrumentellen Aufwandes bei der Synthese ermöglicht und der darüber hinaus für die Laborautomatisierung und die Prozessierung großer Probenzahlen im ml-Bereich besonders geeignet ist. Sie umfaßt im wesentlichen eine Pipette mit einem Dosiersatz; in der Nähe ihres unteren, verengten Endes ist in der Pipette ein reaktiver Träger mit mindestens einem immobilisierten Reaktionspartner vorgesehen.

DE 196 42 777 A 1

Die Erfindung betrifft einen Reaktor für mikrochemische bzw. mikrobiologische Synthesen gemäß der Gattung der Patentsprüche. Sie ist insbesondere zur Anwendung auf dem Gebiet der hochparallelen chemischen Synthese bestimmt.

Es sind relativ großlumige Reaktionsgefäße zur Durchführung mikrochemischer Reaktionen bekannt, die aus einem Behälter mit mindestens einer Öffnung bestehen, wobei für Festphasenreaktionen die Öffnungen mit Filtern oder Fritten abgedeckt sein können. Diese dienen der Vereinigung mehrerer Stoffe in fester, gelöster oder flüssiger Form. Zum Durchführen von Reaktionen mit liquiden Komponenten werden die flüssigen Substanzen mit Hilfe einer Pipette in das Reaktionsgefäß gefüllt. In den letzten Jahren hat sich eine Entwicklung zur Vereinfachung des Laborbetriebs durchgesetzt; sie besteht in der Immobilisierung eines Reaktionspartners. Aufwendige Präzipitations- oder Extraktionsarbeiten sind damit überflüssig. Das Durchführen der Festphasenreaktionen erfordert nur noch die Zufuhr von Lösungen und anschließende Filtrations- oder Absaugschritte, um die in Lösung befindlichen Reaktionspartner wieder zu entfernen. Das Verfahren ist relativ leicht zu automatisieren und eignet sich zur Bewältigung großer Probenzahlen im ml-Volumenbereich. Es wird heutzutage regelmäßig eingesetzt bei biochemischen oder chemischen Umsetzungen wie der Peptidsynthese, der Oligonukleotidsynthese, der kombinatorischen Chemie, Biosays wie ELISA oder RIA und der Chromatographie im "batch"-Verfahren, wie dem Ionenaustausch bei der DNA-Aufreinigung.

Dabei werden üblicherweise die Flüssigkeiten mittels Pipetten dosiert. Die Festphasen befinden sich in einem Gefäß mit oder ohne Filterboden. Aus der Produkt-Information AMS 422 der Firma Abimed (Postfach 11 11, 40736 Langenfeld) ist ein Einweg-Durchflußreaktor mit eingelegter Fritte bekannt. Dieses System ist aber relativ großvolumig und nicht für eine Parallelisierung und Automatisierung geeignet. Befindet sich die Festphase im Gefäß mit Filterboden, werden Zentrifugalkräfte oder ein Vakuum angelegt, um die Lösungen von der Festphase zu trennen. Hierbei werden neben den Filtern auch Vorrichtungen zum Auffangen der Flüssigkeiten benötigt. Befindet sich die Festphase im Gefäß ohne Filterboden, werden die Lösungen durch Pipettierschritte entfernt, wobei dafür Sorge zu tragen ist, daß die Festphasen nicht in die Pipetten gelangen. Diese Problematik führte beispielsweise zu der Entwicklung von Perlen mit magnetisierbarem Kern, welche sich durch das Anlegen eines Magnetfeldes zur Gefäßwandung ziehen lassen und somit weniger gefährdet sind, durch den Pipettierschritt entfernt zu werden.

Bekanntlich erlauben hochparallele chemische Synthesen die Darstellung von Substanzbibliotheken in vergleichsweise sehr kurzer Zeit. Solche Synthesen werden üblicherweise an einem festen Trägermaterial durchgeführt. Dies erleichtert die Aufarbeitung der Proben und das Verschieben des Reaktionsgleichgewichtes. Das Trägermaterial für die Synthese besteht gemeinhin aus chemisch modifizierten Polymerharzkugeln, Polymerharzblöcken oder -schichten, oder Glasperlen bzw. -platten.

Zwei Typen von hochparallelen Syntheseverfahren sind zu unterscheiden: die Synthese in der Mischung und die Synthese von vereinzelt Proben. Mischungsverfahren haben den Nachteil, daß die Information über die Identität der Substanzen bzw. deren Syntheseprotokolle verloren geht und durch Resynthese und/oder aufwendige biochemische Testverfahren wieder beschafft werden muß (Dekontaminationsverfahren).

Einen Ausweg bietet die "mix-and-split" Synthese an. Hierbei werden Substanzbibliotheken mit dem Ziel erzeugt, pro Polymerharzkugel nur eine Substanz darzustellen. Die Identität der Substanz kann abgeleitet werden, wenn genügend Material für eine Analyse erhalten wird. Da die aus einer Perle zu gewinnenden Substanzmengen aber oft sehr gering sind, bzw. für den Biosay benötigt werden, wurden Kodierungsverfahren entwickelt; in einer Parallelsynthese wird dabei die Reaktionsgeschichte der Perle chemisch auf dem Polymerharz festgehalten.

Demgegenüber stehen Methoden, bei welchen alle Bestandteile des Substanzpools in von vornherein räumlich getrennten Bereichen synthetisiert werden. Das Festphasenträgermaterial wird in einer vorgegebenen zweidimensionalen Anordnung ("array") vorgelegt; das jeweilige Reaktionsprotokoll bzw. die entsprechende Zielstruktur ist üblicherweise durch eine xy-Koordinate definiert. Ein sehr illustratives Beispiel wurde von Fodor et al durch den Aufsatz "Light-Directed, Spatially Addressable Parallel Chemical Synthesis" Science 251 (1991) pp. 767-773 veröffentlicht. Darin werden mit lichtempfindlichen Schutzgruppen beschichtete Glsträger durch photolithographische Prozesse in tausend mikroskopisch kleine Substanzfelder aufgedruckt.

Andere Verfahren benutzen ebenfalls Glasplatten, oder mit Perlen gefüllte mikrokompartimentierte Siliziumscheiben, "Chips".

Die Synthese auf mit Polymerharz beschichteten Stäben (Pin-Technologie, siehe "Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid" H. M. Geysen et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) pp. 3998-4002) hat den Vorteil, mit dem weit verbreiteten 96-Kammern-Mikrotitelplattenformat kompatibel zu sein. Die in der Festphasensynthese bereits erprobten und bekannten Trägermaterialien können mit der kommerziellen Variante der Pin-Technik nicht prozessiert werden. Jedoch sind auch schon Pins beschrieben worden, welche mit Glas- oder Polymerperlen gefüllt werden können ("Diversomers: An approach to nonpeptide, nonoligomeric chemical diversity" S. Hobbs De Witt et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) pp. 6909-6913). In all diesen Fällen wirkt sich für die angestrebte Parallelisierung und Automatisierung der Arbeitsschritte ungünstig aus, daß die Pins, Chips oder Röhrchen nur Träger für die feste Phase darstellen; die Flüssigkeitszufuhr ist nicht im System integriert und muß separat durch Eintauchen oder Spülen erfolgen, siehe den Übersichtsartikel "Multiple Peptide Synthesis Methods and Their Applications" G. Jung et al, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 31 (1992) pp 367-383, auch in Angew. Chem. 104 (1992) S. 375 ff.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, einen einfach aufgebauten Reaktor für mikrochemische bzw. mikrobiologische Synthesen zu schaffen, der im Laborbetrieb eine erhebliche Vereinfachung und Beschleunigung der Syntheseschritte sowie eine Verringerung des instrumentellen Aufwandes bei der Synthese ermöglicht und der darüber hinaus für die Laborautomatisierung und die Prozessierung großer Probenzahlen im ml-Bereich besonders geeignet ist.

Gemäß der Erfindung wird diese Aufgabe durch die kennzeichnenden Merkmale des ersten Patentspruchs gelöst. Die vorliegende Erfindung beinhaltet also einen Reaktor, der eine Vereinigung einer Pipette und eines Reaktionsgefäßes darstellt. Diese Bauform aus Reaktor und Pipette besitzt im unteren Bereich, in der Nähe der Pipettenspitze, einen oder mehrere Auslässe und/oder eine mit Filtern oder Fritten abgedeckte Öffnung zum Ein- und/oder Auslassen der Flüssigkeiten und oben einen Ansatz zum Anschluß einer Dosierhilfe. Vorteilhaft kann innerhalb der Pipette ein öffnendes Verschlussmittel, vorzugsweise in Form einer magneti-

sierbaren Kugel vorgesehen sein, die mit der Umfangswandung der Pipette oder durch Lagerung auf einem eingesetzten Ring ein Kugelvolumen bildet.

Es wurde gefunden, daß die Vereinigung von Pipette und Reaktionsgefäß in einem Element überraschenderweise wesentlich zur Vereinfachung und Beschleunigung der Syntheseprozessschritte beiträgt. Zentrifugen, Auffanggefäße, Filter und Absaug- oder Niederschlagsvorrichtungen und deren Bedienung werden durch die Erfindung entbehrlich.

Ein weiterer unerwarteter Vorteil besteht in der verkürzten Reaktionszeit durch die bessere Durchmischung der Reaktanten. Bei Einheit von Pipette und Reaktionsgefäß kann die flüssige Phase beliebig oft aufgenommen und wieder abgegeben werden, die gelösten Reagenzien werden dabei auf besonders effiziente Weise an der Festphase vorbeigeführt. Die Reaktionen sind dadurch wesentlich schneller zum Reaktionsgleichgewicht zu bringen.

Herkömmliche Filtrations- oder Absaugverfahren lassen dies nicht zu und müssen entweder wesentlich längere Inkubationszeiten in Kauf nehmen oder Maßnahmen ergreifen, um die Festphase im Reaktionsgefäß durch Gasströme, mechanisches Schütteln oder Ultraschall zu bewegen, bzw. in einem Ofen oder Temperierbad oder -block zu erwärmen.

Die Erfindung umfaßt jede Kombination aus chemisch oder biologisch modifizierten Oberflächen und einer Pipettenspitze. Die modifizierte Oberfläche kann Bestandteil der Pipettenspitzeninnenoberfläche sein, oder die Pipettenspitze kann als Behälter für Polymerschärfen oder Glaspartikel dienen. Weiterhin kann die Pipettenspitze als Halterung für Glaskapillaren oder Glasgefäße fungieren, wobei die Reaktion auf Festphasenoberflächen in den Glasbehältnissen stattfindet. Die Erfindung umfaßt auch Pipettenspitzen für die homogene chemische und enzymatische Synthese, sowie für Immunoassays. Hierbei befinden sich vorgelegte Reagenzien in kovalent gebundener, adsorbierter oder adhärierter Form in oder auf der Pipettenspitze.

Bevorzugt sind die handelsübliche Einwegpipettenspitzen für Volumina von 0,01 bis 5 ml, welche mit reaktiven Festphasen in loser oder strukturierter Form oder als Block befüllt sind und einen Filter besitzen, um den Austausch von Flüssigkeiten zu gewähren und dabei die Festphasen zurückzuhalten.

Besonders bevorzugt ist eine Pipettenspitze aus Polypolypropylen mit einem Volumen von 0,01 bis 1 ml, welche mit Synthescharz gefüllt ist und deren untere Öffnung mit einer magnetisierbaren Stahlkugel oder Glaskugel verschlossen ist; ihre Seitenwand kann mit Bohrungen von 0,1 mm Durchmesser perforiert sein. Die Perforation erlaubt den Austausch der Flüssigkeit. Die Kugel kann bei Bedarf von außen magnetisch angezogen werden, um das Entfernen des Synthescharzes aus der Spitze oder den Eintrag von Synthesepartikeln in die Spitze zu ermöglichen.

Der erfindungsgemäße Reaktor kann beispielsweise so verwendet werden, daß die Pipettenspitzen mit chemisch oder biologisch aktiven Molekülen oder Gruppen beladen werden. Diese modifizierten Pipettenspitzen werden anschließend - durch bevorzugt automatische Manipulation - mit Lösungsmitteln oder Waschreagenzien gefüllt. Dabei finden in den Pipettenspitzen chemische Synthesen oder biologische Wechselwirkungen statt.

Eine manuelle Synthese eines Dipeptids wird beispielhaft durchgeführt. Hierzu wird eine Kapillare (2 ml Volumen, EM) mit 80 Perlen eines mit einer Aminosäure und einem säurelabilen Linker beladenen Polystyrolharzes (Fmoc-Ala-HMPGB, Novabiochem) befüllt und in eine Pipettenspitze eingesteckt. Die Kapillare wird mit Hilfe einer automatisierten Pipette (Eppendorf) fünfmal mit 20% Piperidin/DMF und fünfmal mit einer Lösung von Fmoc-Phe-OH (0,25 M),

HBTU (0,25 M), HOBT (0,25 M), DIEA (0,5 M) in DMF und dreimal mit DMF gespült. Die Perlen werden in 0,25 ml 5% TFA/DCM überführt und nach 15 min abfiltriert. Das Filtrat wird eingedampft und in 0,1 ml Acetonitril/0,1% TFA aufgenommen. 20 ml werden mittels HPLC (RP 18 Säule, linearer Gradient von 5 auf 95% Acetonitril/Wasser in 35 min, UV-Detektion bei 220 nm) analysiert. Eine Peakidentifikation geschieht durch Vergleich mit Referenzsubstanzen. Das HPL-Chromatogramm zeigt das Produkt Fmoc-Phe-Ma-OH (Retentionszeit 23,088 min) in hoher Reinheit und guter Ausbeute.

Eine automatisierte Synthese wird beispielsweise an Hand des Dodecapeptids H-Glu-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln-OH durchgeführt. Zehn perforierte und mit Kugelvolumen versehene Pipettenspitzen wurden mit je 2 mg Synthescharz Fmoc-Gln(Trt)-SASRIN (Bachem, Heidelberg) befüllt. Die Spitzen werden auf einen Pipettierroboter (Tomtec Quadra, Zinsser Analytic, Frankfurt) gesteckt und durch Aufsaugen, Inkubieren und Abgeben von in Mikrotiterplattengefäße vorgelegten Reagenzien elf Syntheszyklen unterzogen. Dabei besteht ein Syntheszyklus aus folgenden Schritten:

- 1 × je 2,3 min Inkubation mit 0,05 ml Dichlormethan,
- 2 × je 2,3 min Inkubation mit 0,05 ml Dimethylformamid (DMF),
- 4 × je 2 min Inkubation mit 0,05 ml 20%igem Piperidin/DMF aus einem Gefäß mit insgesamt 0,15 ml Reagenzlösung,
- 1 × je 2 min Inkubation mit 0,05 ml Dichlormethan,
- 3 × je 2 min Inkubation mit 0,05 ml DMF,
- 6 × je 2,25 min Inkubation mit 0,05 ml 0,5 M Fmoc-Aminosäure-OP-Ester, 1 M Hydroxybenzotriazol (HOBT) 1 M Diisopropylethylamin (DIEA) aus einem Gefäß mit insgesamt 0,17 ml Reagenzlösung,
- 1 × je 2,3 min Inkubation mit 0,05 ml DMF,
- 2 × je 2,3 min Inkubation mit 0,05 ml Acetanhydrid/DIEA/HOBT,
- 1 × je 2,3 min Inkubation mit 0,05 ml Dichlormethan.

Die aus den Pipettenspitzen erhaltenen Produkte werden mit Trifluoressigsäure/Wasser vom Synthescharz abgespalten, entschützt und durch Etherpräzipitation isoliert. Die Analytik dieser Produkte mit Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) zeigt Reinheiten von über 95%; ihre Analytik mittels Massenspektrometrie bestätigt die Richtigkeit der Strukturen. Unterschiede zwischen den Produkten aus den verschiedenen Pipettenspitzen wurden nicht festgestellt. Die Qualität der Substanzen ist von gleicher Güte wie die einer kommerziell erhältlichen, HPLC-gereinigten Referenzsubstanz (Hirudin 54-65 desulfat, Bachem, Heidelberg).

Die Erfindung wird nachstehend an Hand der schematischen Zeichnung von vier Ausführungsbeispielen näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 eine Pipettenspitze mit Magnetkugel,

Fig. 2 eine unter verschlossene Pipettenspitze,

Fig. 3 eine Pipettenspitze, die durch Fritte oder Filter mit reaktiver Oberfläche verschlossen ist und

Fig. 4 eine durch Fritte oder Filter ohne reaktive Oberfläche verschlossene Pipette.

In Fig. 1 ist ein erfindungsgemäßer Reaktor dargestellt, bei dem eine an sich übliche Pipette 1, die einen Ansatz 2 für eine nicht dargestellte Dosierhilfe aufweist, im unteren, verengten Umfangsbereich, am ein- bzw. auslaßseitigen Ende 3 mit lock- bzw. schlitzartigen Öffnungen 4 versehen ist. Im ein- bzw. auslaßseitigen Ende 3 ist weiterhin eine mit diesem ein Kugelvolumen bildende Kugel 5 vorgesehen, die bevorzugt aus einem magnetisierbaren Material gefertigt ist.

Oberhalb der Kugel 5 ist ein reaktiver Träger 6 in Perlenform eingebracht, wobei die Füllstandshöhe dieser Perlen bevorzugt so bemessen ist, daß alle Öffnungen 4 erfällt werden. Die Öffnungen 4 dienen dem Austausch von Flüssigkeit, während das durch die Kugel 5 und das ein- bzw. auslaßseitige Ende 3 gebildete Kugelventil dem Aufnehmen oder dem Entfernen der Perlen (Partikel) 6 aus der Spitze der Pipette 1 dient.

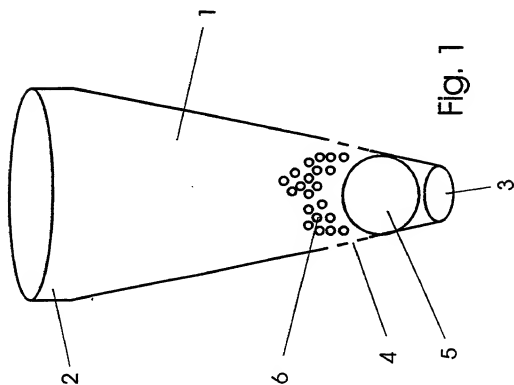
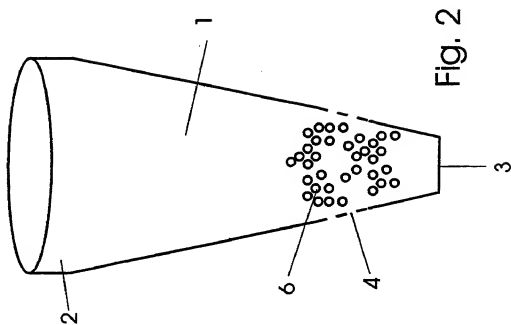
Fig. 2 stellt eine zweite Ausführungsform der Pipette 1 dar, bei der aber der Pipettenaustritt, das untere, verengte Ende 3, verschlossen ausgeführt ist. Bei dieser Ausführungsform sind wieder loch- oder schlitzzartige Öffnungen 4 und ein reaktiver Träger 6 in Perlenform, jedoch ist kein Kugelventil vorgesehen.

In Fig. 3 ist eine Pipette 1 am ein- bzw. auslaßseitigen Ende 3 mit einer Fritte oder einem Filter 7 versehen, der/ dem eine entsprechend reaktive Oberfläche gegeben ist, so daß der gesonderte reaktive Träger in Perlenform entfallen kann. Die Fritte oder der Filter 7 enthält die Öffnungen für den Flüssigkeitsaustausch.

Fig. 4 stellt eine weitere Ausführungsform dar, bei der das ein- bzw. auslaßseitige Ende 3 zwar mit einer Fritte oder einem Filter 7 verschlossen, der reaktive Träger 6 jedoch wiederum in Perlenform in die Pipette 1 eingebracht ist. Das hat den Vorteil, das der reaktive Träger 6 im Bedarfsfall leichter auswechselbar ist.

Patentsprüche

1. Reaktor für mikrochemische und/oder mikrobiologische Reaktionen, der eine Pipette mit einem Dosiersatz umfaßt, **dadurch gekennzeichnet**, daß in der Pipette in der Nähe ihres unteren, verengten Endes ein reaktiver Träger mit mindestens einem immobilisierten Reaktionspartner vorgesehen ist.
2. Reaktor nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der reaktive Träger in Form von Partikeln ausgebildet ist.
3. Reaktor nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der reaktive Träger als Fritte oder Filter ausgebildet ist.
4. Reaktor nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Pipette in ihrem unteren Umfangsbereich mit loch- bzw. schlitzzförmigen Öffnungen versehen ist.
5. Reaktor nach den Ansprüchen 2 und 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Partikel den Umfangsbereich mit den loch- oder schlitzzförmigen Öffnungen entnehmen.
6. Reaktor nach mindestens einem der voranstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Pipette an ihrem unteren, verengten Ende verschlossen ist.
7. Reaktor nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Pipette an ihrem unteren, verengten Ende mit einem Kugelventil verschließbar gestaltet ist.
8. Reaktor nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Pipette an ihrem unteren, verengten Ende mit einer Fritte oder einem Filter versehen ist.
9. Reaktor nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Kugel des Kugelventils magnetisierbar ausgebildet ist.
10. Reaktor nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Pipette aus Polypropylen besteht.
11. Reaktor nach Anspruch 1 oder 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Volumen der Pipette 0,01 bis 1 ml umfaßt.



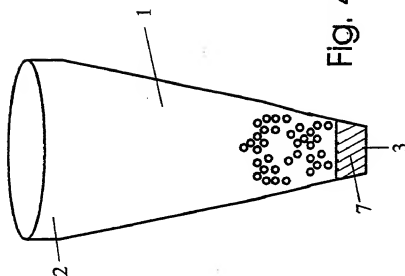


Fig. 4

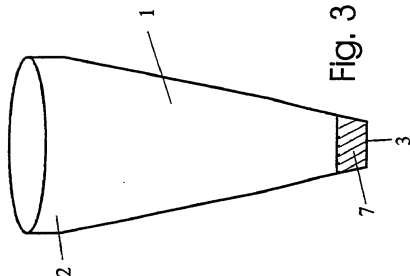


Fig. 3